

• 监测与检验 •

高效液相色谱法测定尿中甲苯代谢产物的实验研究

Methodology study on metabolites of toluene in urine by high performance liquid chromatography (HPLC)

肖润梅^{1,2}, 孙敬智², 黄兆慧¹, 冯加武², 陈勇¹

(1. 湖北大学生命科学院中药生物技术省重点实验室, 湖北 武汉 430062; 2. 湖北省新华医院理化实验室, 湖北 武汉 430015)

摘要: 建立高效液相色谱/二极管阵列检测法同时测定尿样中马尿酸含量的方法, 并确定了该方法最佳样品预处理条件, 优化了色谱分离及检测条件, 灵敏、准确, 能够满足有害物质代谢产物的监测要求。

关键词: 高效液相色谱法; 代谢产物; 马尿酸

中图分类号: R446.12 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2014)03-0222-02

DOI:10.13631/j.cnki.zgggxyx.2014.03.029

对苯、甲苯职业暴露的工人进行生物监测是预防职业损伤的必要手段。马尿酸(HA)、甲基马尿酸(MHA)是苯、甲苯的主要代谢物^[1], 作为接触生物标志物受到广泛应用。我国1996年就推荐了卫生标准《尿中马尿酸、甲基马尿酸的高效液相色谱测定法》(WS/T53—1996)。本实验优化样品预处理条件及色谱分离条件, 测定了尿样中代谢产物, 为职业卫生监测工作提供了更高效、灵敏的分析方法。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

Waters 2695-2998 高效液相色谱仪(配光电二极管阵列检测器, 美国 Waters 公司), KQ-500E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司), DK-450B 型电热恒温水槽(上海深信实验仪器有限公司), HP-01 系列溶剂过滤器, DV215CD 万分之一电子天平(美国奥豪斯公司), TDL-468 型高速离心机(上海安亭科学仪器厂), XK96-B 快速混匀器(姜堰市新康医疗器械有限公司)。本实验所用试剂除另有说明外均为分析纯试剂, 水为去离子水, 甲醇(色谱纯 J. T. Baker), HA 对照品(中国药品生物制品检定 140738-200501), 盐酸(信阳市化学试剂有限公司, 批号: XK13-201096-0031) 优级纯, 冰乙酸(批号: T20110913)、氯化钠(批号: F20110816)、乙酸乙酯(批号: T20110629) 均购于国药集团化学试剂有限公司。

1.2 色谱条件

色谱柱: symmetry C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 采用梯度洗脱方式, 二极管阵列检测波长, 测定程序见表1; 流速 0.7 ml/min; 柱温 35 °C; 进样量 10 μl。

1.3 尿样预处理方法

依据卫生标准 WS/T53—1996 测定尿中 HA、MHA 与处理

试剂比例, 移取 0.25 ml 尿样于离心管中, 加入 75 mg NaCl、0.05 ml HCl 溶液, 加入 0.5 ml 萃取剂, 旋涡混合萃取 3 min, 以 1 000 r/min 离心 5 min, 取 0.4 ml 萃取剂于具塞试管在低于 70 °C 水浴中挥发至干; 用 1.0 ml 流动相溶解残留物, 10 000 r/min 离心 20 min 后进样分析。

1.4 工作曲线的绘制

HA 标准储备液: 准确称取 HA 50.0 mg, 用超纯水定容至 50 ml。此溶液的浓度为 1.0 mg/ml。HA 标准液: 取标准储备液配制成 0 μg/ml、10 μg/ml、50 μg/ml、100 μg/ml、200 μg/ml、500 μg/ml 的 HA 标准系列, 按 3 样品处理方法进行处理后, 以外标法进行定量测定。

1.5 样品测定

取制备好的样品溶液, 在色谱条件下进行分析测定, 保留时间定性, 峰面积定量。

2 结果与讨论

2.1 流动相及洗脱程序的确定

实验过程中发现按照 WS/T53—1996 在流动相甲醇: 水: 冰乙酸 = 20: 80: 0.01 体系下 HA 出现色谱峰保留时间在 14 ~ 16 min, 色谱峰保留时间出现漂移现象。醋酸能减小谱带拖尾, 显著改善峰形的对称性, 向水相中增加醋酸, 通过考察流动相中醋酸含量对测定组分保留时间、分离度等的影响, 最终确定将加入水的冰乙酸的浓度提高 10 倍。采用梯度洗脱方式确定流动相的比例。本实验流动相的梯度选择甲醇的起始浓度为 35%, 终止浓度为 20%。HA 的色谱峰保留时间在甲醇浓度为 30% 时出现, 保留时间为 9.913 min, 由于梯度洗脱平衡柱子需要的时间长, 本实验确定使用流动相(甲醇: 水: 冰乙酸 = 30: 70: 0.1) 的等度洗脱方式。

2.2 二极管阵列检测波长及检测程序的确定

在 210 ~ 360 nm 波长范围内, 对待测组分进行紫外光谱扫描, 从图 1 可以看出 HA 的最大吸收波长为 227 nm。由于尿样中的杂质较多, 大部分会在短波区产生吸收, 为避免干扰, 选择代谢物的检测波长为 235 nm, 其标准和样品色谱图见图 2。

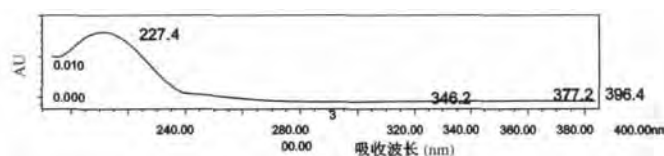


图 1 HA 最大吸收波长

2.3 样品预处理条件的优化

2.3.1 萃取溶剂的选择

由图 3 可见, 乙酸乙酯、乙醚、二

收稿日期: 2013-04-22; 修回日期: 2013-06-27

作者简介: 肖润梅(1973—), 女, 硕士, 副主任药师, 主要从事生物样品检测工作。

通讯作者: 陈勇, E-mail: runmeixiao2013@163.com。

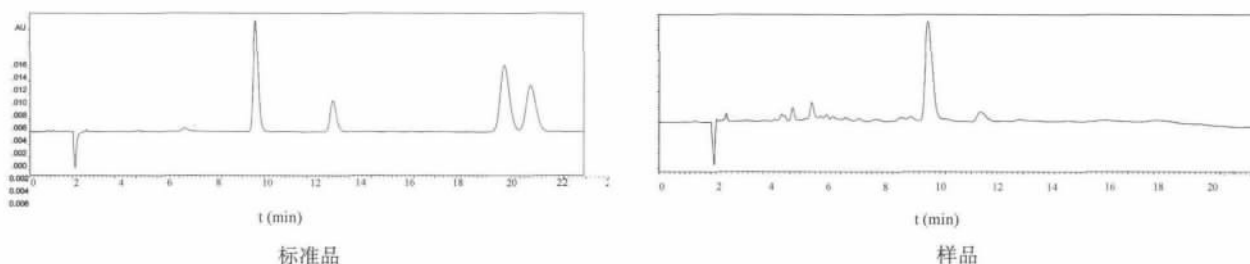


图2 HA、MHA 标准品、样品色谱图

氯甲烷、二氯甲烷-异丙醇 4 种不同极性溶剂对同一组分提取效率的影响, 结果表明乙醚由于沸点低, 在提取的过程中易挥发, 不容易定量; 确定选择乙酸乙酯为萃取剂。

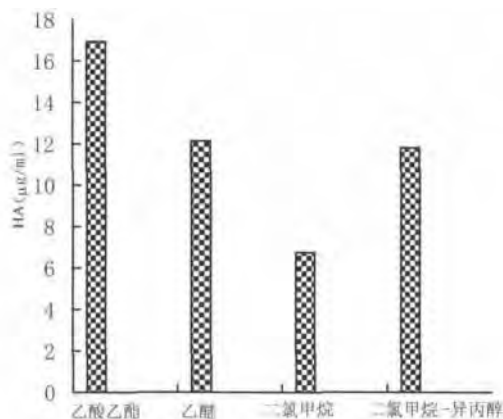


图3 萃取溶剂的选择

2.3.2 样品与萃取剂比例的选择 萃取溶剂用量过少时, 目标组分不能被充分萃入有机相; 而溶剂用量过多, 则会导致样品被稀释, 并延长挥发萃取液的时间。综合考虑 4 种组分的萃取效率, 选择样品与萃取剂的最佳体积比为 1:1。见图 4。

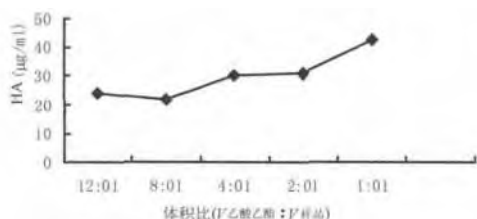


图4 样品与萃取剂比例的选择

2.3.3 标准曲线 将待测组分的标准溶液配制系列浓度, 按照“1.3 尿样预处理方法”处理样品, 进样测定并建立待测组分的标准曲线, 见图 5。本实验方法测定马尿酸在 20~500 mg/L 范围内线性关系良好, 线性方程为 $Y = 1.16e^{+004}x + 3.14e^{+005}$, 相关系数为 0.999, 可满足测定需要。

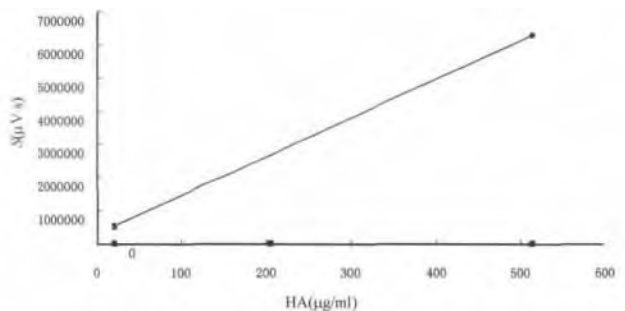


图5 HA 标准曲线

2.3.4 检出限 将高效液相色谱仪调节至最佳测定状态, 按研制的测定方法连续 10 次测定接近空白浓度 (10 μg/ml) 的 HA 标准溶液, 计算浓度平均值和标准差, 以 3 倍的标准差所对应的浓度为检出限, 得到尿中 HA 的最低检出浓度为 0.65 mg/L。

2.3.5 准确度和精密度试验 取 3 份新鲜尿样, 制成均匀的混合样品。分成 4 组, 每组 6 个样品, 一组为空白, 其余三组样品经处理后分别加入高、中、低浓度的标准溶液 (100 μg/ml, 200 μg/ml, 400 μg/ml 的 HA)。各测定 3 次, 取平均值, 减去空白, 计算精密度和平均加标回收率。见表 1。各组分的平均回收率为 97.3%~104%, 相对标准偏差均小于 5%, 结果准确可靠。

表1 HA 在尿样中的加标回收率

HA 浓度 (μg/ml)	加标量(ρ_A) (mg/L)	测定值(ρ_F) (mg/L)	加标回收率(R) (%)	RSD (%)
100	102.70	106.78	103.98	1.3
200	205.41	199.95	97.35	4.0
400	513.42	514.76	100.26	0.8

2.3.6 实际样品的测定 采集 6 份尿样按本方法处理后进样分析, 并采用比重法对尿样中的 HA 浓度进行校正, 结果分别为 254.06、146.32、566.26、527.19、200.72、23.82、189.93 mg/L。本实验中 HA 的测定值波动较大, 可能是由于 HA 在低水平甲苯暴露时受环境影响较大, 将其作为甲苯的生物接触标志物的特异性相对较差^[2,3]。

3 小结

本文确定了最佳样品预处理条件, 优化了色谱分离及检测条件, 提高了检测灵敏度, 减小了尿样基质及共存物的干扰, 所建立的 HPLC 法具有灵敏、准确、快速等特点, 能够满足有害物质代谢产物生物监测的要求。

参考文献:

- [1] Akgur A, Ozturk P, Kurtulmu Y, *et al.* Medicolegal aspects of blood—urine toluene and urinary orthocresol concentrations in toluene exposure [J]. Turk J Med Sci, 2001, 31 (5): 451-419.
- [2] Krupp D, Doberstein N, Shi I, *et al.* Hippuric acid in 24-hour urine collections is a potential biomarker for fruit and vegetable consumption in healthy children and adolescents [J]. Nutr, 2012, 142 (7): 1314-1320.
- [3] Henning S M, Wang P, Abgaryan N, *et al.* Phenolic acid concentrations in plasma and urine from men consuming green or black tea and potential chemopreventive properties for colon cancer [J]. Mol Nutr Food Res, 2013, 57 (3): 483-493.